

Nederlandsch Octrooibureau

1817-1997

Octrooigemachtigden
European Patent Attorneys

Certified Netherlands translation of a European Patent (Art 65 EPC)

Merken- & Modellen-
gemachtigden
Trademark Design
Attorneys

Patent number	1073339
Patentee	Novozymes A/S
Application filed on	30 March 1999
Application number	99911638.7
Patent mentioned in European Patent Bulletin	27 November 2002
Patent will expire on	30 March 2019
Annuities for maintaining the patent will be due on	31 March

Filing date of certified Netherlands translation	25 February 2003
---	------------------

POSTAL

Correspondentie / Correspondence
Postbus 29720 / P.O. Box 29720
2502 LS Den Haag / 2502 LS The Hague
The Netherlands
E-mail: info@octrooibureau.nl
www.octrooibureau.nl

Bureau Den Haag
Scheveningsweg 82 2517 KZ Den Haag
Tel.: +31 (0)70 352 75 00 Fax: +31(0)70 352 75 28
Bureau Wageningen
Agro Business Park 48 6708 PW Wageningen
Tel.: +31 (0)317 479 790

Het Nederlandsch Octrooibureau
is een maatschap die bestaat uit
beroepsvennootschappen. Iedere
aansprakelijkheid is beperkt tot het
bedrag dat in het desbetreffende geval
onder onze beroepsaansprakelijkheids-
verzekering wordt uitbetaald.

Nederlandsch Octrooibureau is
a partnership of professional
corporations. Any liability shall
be limited to the amount which
is paid out under the firm's
professional liability policy
in the matter concerned.

NZAS-0032208

Nederlandsch Octrooibureau

AAAA 1332

Octrooigemachtigden
European Patent Attorneys

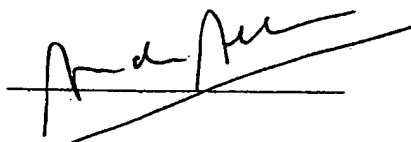
Merken- & Modellen-
gemachtigden
Trademark Design
Attorneys

VERKLARING

Ondergetekende, *Ir A.W.M. van den Akker,*

ingeschreven in het Register van Octrooigemachtigden bedoeld in Artikel 3 van het Octrooigemachtigdenreglement betreffende het optreden als gemachtigde voor het Bureau voor de Industriële Eigendom, verklaart hierbij dat de aangehechte vertaling naar zijn beste weten een volledige en getrouwe vertaling is van de tekst van het Europese octrooischrift nr. 1073339 (B1).

's-Gravenhage, *3 februari 2003.*



Correspondentie / Correspondence

Postbus 29720 / P.O. Box 29720

302 LS Den Haag / 2502 LS The Hague

The Netherlands

E-mail: info@octrooibureau.nl

www.octrooibureau.nl

Bureau Den Haag

Scheveningseweg 82 2517 KZ Den Haag

Tel: +31 (0)70 352 75 00 Fax: +31(0)70 352 75 28

Bureau Wageningen

Agro Business Park 48 6708 PW Wageningen

Tel: +31 (0)317 479 790

Het Nederlandsch Octrooibureau is een maatschap die bestaat uit beroepsvennootschappen. Iedere aansprakelijkheid is beperkt tot het bedrag dat in het desbetreffende geval onder onze beroepsaansprakelijkheidsverzekering wordt uitbetaald.

Nederlandsch Octrooibureau is a partnership of professional corporations. Any liability shall be limited to the amount which is paid out under the firm's professional liability policy in the matter concerned.

NZAS-0032209

BEREIDING VAN DEEG EN GEBAKKEN PRODUCTEN

5

Beschrijving**GEBIED VAN DE UITVINDING**

10

[0001] De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de bereiding van een deeg of een gebakken product bereid uit het deeg. Meer in het bijzonder heeft zij betrekking op zo'n werkwijze waarbij het brood een verbeterde zachtheid heeft, zowel wanneer het op dezelfde dag wordt gegeten als wanneer het na enkele dagen bewaring

15 wordt gegeten.

ACHTERGROND VAN DE UITVINDING

[0002] Het is algemeen bekend dat de zachtheid van brood achteruitgaat tijdens bewaring vanaf het tijdstip van bakken tot het tijdstip van consumptie. De term "oudbakken worden" wordt gebruikt voor het beschrijven van deze ongewenste veranderingen in de eigenschappen van het brood. Oudbakken worden resulteert in een toeneming van de stevigheid van de kruim, een vermindering van de elasticiteit van de kruim en veranderingen in de korst, die taai en leerachtig wordt.

20

25 [0003] Enzymatische vertraging van oudbakken worden door middel van diverse amylasen is beschreven. Zo beschrijven US 2 615 810; US 3 026 205 en O. Silberstein, "Heat-Stable Bacterial Alpha-Amylase in Baking", Baker's Digest 38(4), augustus 1964, blz. 66-70 en 72, de toepassing van α -amylase. WO 91/04669 (Novo Nordisk) beschrijft de toepassing van een maltogeen α -amylase uit *Bacillus stearothermophilus*. Het is ook bekend α -amylase toe te passen voor het vertragen van oudbakken worden.

30

[0004] Het is ook bekend een fosfolipase toe te voegen aan deeg. Zo beschrijven US 4 567 046 en EP 171 995 (beide van Kyowa Hakko) dat de toevoeging van fosfo-

EU 1 073 339 B1

lipase A de eigenschappen van deeg en brood verbetert, omvattende vertraging van oudbakken worden.

- [0005] M.R. Kweon e.a., Journal of Food Science, 59 (5), 1072-1076 (1994) beschrijven het effect van 2-4 gew. % fosfolipide-hydrolysaat tezamen met een amylase dat oudbakken worden tegengaat op de retrogradatie van zetmeel in brood.

OVERZICHT VAN DE UITVINDING

- [0006] De uitvinders bevestigden dat de toevoeging van een maltogeen α -amylase de snelheid van kruimverstevinging tijdens bewaring gedurende 1-7 dagen na bakken vermindert, maar zij vonden dat er behoefte is aan verbetering van de zachtheid in de beginperiode na bakken, in het bijzonder de eerste 24 uur na bakken. Zij vonden verder dat dit kan worden verwezenlijkt onder toepassing van een fosfolipase, zodanig dat brood gemaakt door de gecombineerde toepassing van een maltogeen α -amylase en een fosfolipase verbeterde zachtheid heeft, zowel bij eten op dezelfde dag en als bij bewaring gedurende enkele dagen na bakken. Er is geen significante verandering in de smaak of de geur van het gebakken product

- [0007] Dienovereenkomstig verschaft de uitvinding een werkwijze voor de bereiding van een deeg of een gebakken product bereid uit het deeg, welke omvat het aan het deeg toevoegen van een maltogeen α -amylase en een fosfolipase. De uitvinding verschaft ook een deeg en een voormengsel dat deze bestanddelen omvat.

GEDETAILEERDE BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

- [0008] Het maltogene α -amylase gebruikt in de uitvinding kan elk amylase zijn dat effectief is in het vertragen van het oudbakken worden (kruimverstevinging) van gebakken producten.

- [0009] Het amylase heeft bij voorkeur een temperatuuroptimum in aanwezigheid van zetmeel in het traject van 30-90°C, bij voorkeur 50-80°C, in het bijzonder 55-75°C, bijvoorbeeld 60-70°C. Het temperatuuroptimum kan worden gemeten in een 1% ige oplossing van oplosbaar zetmeel bij pH 5,5.

- [0010] Het maltogene α -amylase (EC 3.2.1.133) kan afkomstig zijn van Bacillus. Een maltogeen α -amylase afkomstig van B. stearothermophilus stam NCIB 11837

EU 1 073 339 B1

is in de handel verkrijgbaar bij Novo Nordisk A/S onder de handelsbenaming Novamyl®. Het is verder beschreven in US 4 598 048 en US 4 604 355 en in C. Christophersen e.a., Starch, vol. 50, nr 1, 39-45 (1997).

- [0011] Het maltogene α -amylase wordt toegevoegd in een effectieve hoeveelheid voor het vertragen van het oudbakken worden (kruimversteving) van het gebakken product. De hoeveelheid maltogeen α -amylase zal typisch in het traject van 0,01-10 mg enzymeiwit per kg bloem zijn, bijvoorbeeld 1-10 mg/kg. Het maltogene α -amylase wordt bij voorkeur toegevoegd in een hoeveelheid van 50-5000 MANU/ kg bloem, bijvoorbeeld 100-1000 MANU/kg. Eén MANU (Maltogenic Amylase Novo Unit) kan worden gedefinieerd als de hoeveelheid enzym die vereist is voor het afgeven van één μ mol maltose per min bij een concentratie van 10 mg maltotriose (Sigma M 8378) substraat per ml 0,1 M citraatbuffer, pH 5,0 bij 37°C gedurende 30 min.

Fosfolipase

15

[0012] Het fosfolipase kan A_1 - of A_2 -activiteit hebben voor het verwijderen van vetzuur uit het fosfolipide en voor het vormen van een lysofosfolipide. Het kan al dan niet lipaseactiviteit hebben, d.w.z. activiteit op triglyceriden. Het fosfolipase heeft bij voorkeur een temperatuuroptimum in het traject van 30-90°C, bijvoorbeeld 30-70°C.

- 20 [0013] Het fosfolipase kan van dierlijke oorsprong zijn, bijvoorbeeld uit pancreas (bijvoorbeeld runder- of varkenspancreas), slangengif of bijengif. Alternatief kan het fosfolipase van microbiële oorsprong zijn, bijvoorbeeld uit draadschimmels, gist of bacteriën, zoals de genus of species *Aspergillus*, *A. niger*, *Dictyostelium*, *D. discoideum*, *Mucor*, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*, *Neurospora*, *N. crassa*,
25 *Rhizomucor*, *R. pusillus*, *Rhizopus*, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*, *Sclerotinia*, *S. libertiana*, *Trichophyton*, *T. rubrum*, *Whetzelinia*, *W. sclerotiorum*, *Bacillus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Citrobacter*, *C. freundii*, *Enterobacter*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*, *Erwinia*, *E. herbicola*, *Escherichia*, *E. coli*, *Klebsiella*, *K. pneumoniae*, *Proteus*, *P. vulgaris*, *Providencia*, *P. stuartii*, *Salmonella*, *S. typhimurium*, *Serratia*, *S. liquefasciens*, *S. marcescens*, *Shigella*, *S. flexneri*, *Streptomyces*, *S. violaceoruber*, *Yersinia* of *Y. enterocolitica*. Een voorkeursfosfolipase is afgeleid van een stam van *Fusarium*, in het bijzonder *F. oxysporum*, bijvoorbeeld van de stam DSM 2672, als beschreven in gelijktijdig lopende PCT/DK 97/00557.

EU 1 073 339 B1

[0014] Het fosfolipase wordt toegevoegd in een hoeveelheid die de zachtheid van het brood gedurende de eerste tijd na bakken, in het bijzonder de eerste 24 uur, verbetert. De hoeveelheid fosfolipase zal typisch in het traject van 0,01-10 mg enzym-eiwit per kg bloem zijn (bijvoorbeeld 0,1-5 mg/kg) of 200-5000 LEU/kg bloem
5 (bijvoorbeeld 500-2000 LEU/kg).

[0015] Een fosfolipase met lipaseactiviteit wordt bij voorkeur toegevoegd in een hoeveelheid overeenkomend met een lipaseactiviteit van 20-1000 LU/kg bloem, in het bijzonder 50-500 LU/kg. Eén LU (lipase-eenheid) wordt gedefinieerd als de hoeveelheid enzym die vereist is voor het afgeven van 1 μ mol boterzuur per min bij
10 30,0°C; pH 7,0; met arabische gom als emulgeermiddel en tributyrin als substraat.

Fosfolipaseactiviteit (LEU)

[0016] In de LEU-test wordt de fosfolipaseactiviteit bepaald uit het vermogen lecithine te hydrolyseren bij pH 8,0, 40°C. De hydrolyse- reactie kan worden gevolgd door titratie met NaOH gedurende een reactietijd van 2 min. Het fosfolipase van varkenspancreas heeft een activiteit van 510 LEU/mg (genomen als standaard) en het fosfolipase van *Fusarium oxysporum* heeft een activiteit van 1540 LEU/mg.
15

20 Fosfolipide

[0017] Het fosfolipase kan inwerken op fosfolipide verschaft door bloem in het deeg, zodat de afzonderlijke toevoeging van een fosfolipide niet nodig is. Het verzachtende effect kan echter worden verhoogd door toevoegen van een fosfolipide, bij voorkeur in een hoeveelheid van 0,05-20 g/kg bloem, bijvoorbeeld 0,1-10 g/kg. Het
25 fosfolipide kan een diacyl-glycero-fosfolipide zijn, zoals lecithine of cefaline.

Deeg

[0018] Het deeg van de uitvinding omvat in het algemeen tarwemeel of tarwebloem en/of andere typen meel, bloem of zetmeel zoals maïsmeel, maïszetmeel, roggemeel, roggebloem, haverbloem, havermeel, sojabloem, gierstmeel, gierstbloem, aardappelmeel, aardappelbloem of aardappelzetmeel.
30

EU 1 073 339 B1

[0019] Het deeg van de uitvinding kan vers, ingevroren of kort gebakken zijn.

[0020] Het deeg van de uitvinding is normaliter een gegist of gedeseemd deeg of een deeg dat zal worden onderworpen aan gisting of deseming. Het deeg kan op verschillende wijzen worden gegist of gedeseemd, zoals door toevoeging van chemische gistingsmiddelen, bijvoorbeeld natriumbicarbonaat of door toevoegen van een desem (fermenterend deeg), maar het verdient de voorkeur het deeg te gisten door toevoeging van een geschikte gistculture, zoals een culture van *Saccharomyces cerevisiae* (bakkersgist), bijvoorbeeld een in de handel verkrijgbare stam van *S. cerevisiae*.

[0021] Het deeg kan ook andere conventionele deegbestanddelen omvatten, bijvoorbeeld: eiwitten, zoals melkpoeder, gluten en soja; eieren (gehele eieren, eierdooiers of eierwitten); een oxideermiddel zoals ascorbinezuur: kaliumbromaat, kaliumjodaat, azodicarbonamide (ADA) of ammoniumpersulfaat; een aminozuur zoals L-cysteïne; een suiker; een zout zoals natriumchloride, calciumacetaat, natriumsulfaat of calciumsulfaat.

[0022] Het deel kan vet (triglyceride) omvatten, zoals gegraneerd vet of bakvet, maar de uitvinding is in het bijzonder van toepassing op een deeg waaraan minder dan 1 gew. % vet (triglyceride) is toegevoegd en in het bijzonder op een deeg dat is bereid zonder toevoeging van vet.

[0023] Het deeg kan verder een emulgeermiddel omvatten zoals mono- of diglyceriden, diacetylwynsteenzuuresters van mono- of diglyceriden, suikeresters van vetzuren, polyglycerolesters van vetzuren, melkzuuresters van monoglyceriden, azijnzuuresters van monoglyceriden, polyoxyethyleenstearaten, of lysolecithine, maar de uitvinding is in het bijzonder van toepassing op een deeg dat is bereid zonder toevoeging van emulgeermiddelen (anders dan eventueel fosfolipide).

25

Additioneel enzym

[0024] Eventueel kan een additioneel enzym worden gebruikt tezamen met het maltogene α -amylase en het fosfolipase. Het addionele enzym kan een tweede amylase zijn, zoals een amyloglucosidase, een β -amylase, een cyclodextrine-glucanotransferase, of het additionele enzym kan een peptidase zijn, in het bijzonder een exopeptidase, een transglutaminase, een lipase, een cellulase, een hemicellulase, in het bijzonder een pentosanase zoals xylanase, een protease, een eiwit-disulfide-isomerase,

30
EU 1 073 339 B1

bijvoorbeeld een eiwit-disulfide-isomerase als beschreven in WO 95/00636, een glycosyltransferase, een vertakkend enzym (1,4- α -glucan-vertakkend enzym), een 4- α -glucanotransferase (dextrine-glycosyltransferase) of een oxidoreductase, bijvoorbeeld een peroxidase, een laccase, een glucose-oxidase, een pyranose-oxidase, een lipoxygenase, een L-aminozuur-oxidase of een koolhydraat-oxidase.

[0025] Het additionele enzym kan van elke oorsprong zijn, omvattende van zoogdier- en plantaardige, en bij voorkeur van microbiële (bacteriële, gist- of fungale) oorsprong en kan worden verkregen door technieken die conventioneel worden gebruikt in de techniek.

10 [0026] Het xylanase is bij voorkeur van microbiële oorsprong, bijvoorbeeld afgeleid van een bacterium of fungus, zoals een stam van *Aspergillus*, in het bijzonder van *A. aculeatus*, *A. niger* (vgl WO 91/19782), *A. awamori* (WO 91/18977), of *A. tubigenensis* (WO 92/01793), van een stam van *Trichoderma*, bijvoorbeeld *T. reesei*, of van een stam van *Humicola*, bijvoorbeeld *H. insolens* (WO 92/17573, de inhoud
15 waarvan hier wordt opgenomen door verwijzing). Pentopan® en Novozym 384® (beide van Novo Nordisk A/S) zijn in de handel verkrijgbare xylanasepreparaten geproduceerd door *Trichoderma reesei*.

[0027] Het amyloglucosidase kan een *A. niger* amyloglucosidase zijn (zoals AMG™, verkrijgbaar bij Novo Nordisk A/S, Denemarken). Andere bruikbare amy-
20 laseproducten omvatten Grindamyl® A 1000 of A 5000 (verkrijgbaar bij Grindsted Products, Denemarken) en Amylase® H of Amylase® P (verkrijgbaar bij Gist-Brocades, Nederland).

[0028] Het glucose-oxidase kan een fungaal glucoseoxidase zijn, in het bijzonder een *Aspergillus niger* glucose-oxidase (zoals Gluzyme®, verkrijgbaar bij Novo Nordisk A/S, Denemarken).
25

[0029] Het protease kan in het bijzonder Neutrase® zijn (verkrijgbaar bij Novo Nordisk A/S, Denemarken).

[0030] Het lipase kan zijn afgeleid van een stam van *Thermomyces* (*Humicola*), *Rhizomucor*, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus* of *Pseudomonas*, in het bijzonder van
30 *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*), *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* of *Rhizopus arrhizus* of *Pseudomonas cepacia*. In specifieke uitvoeringsvormen kan het lipase Lipase A of Lipase B afgeleid van *Candida antarctica* zijn, als beschreven in WO 88/02775, of het lipase kan zijn

EU 1 073 339 B1

afgeleid van *Rhizomucor miehei* als beschreven in EP 238 023, of *Humicola lanuginosa*, beschreven in EP 305 216, of *Pseudomonas cepacia* als beschreven in EP 214 761 en WO 89/01032.

5 Gebakken product

[0031] De werkwijze van de uitvinding kan worden gebruikt voor elke soort gebakken product bereid uit deeg, hetzij van een zachte of een croquante aard, hetzij van een wit, een licht of een donker type. Voorbeelden zijn brood (in het bijzonder
10 witbrood, volkorenbrood of roggebrood), typisch in de vorm van brood of broodjes, stokbrood, pitabrood, tortilla's, gebak, pannenkoeken, biscuit, koekjes, pasteikorst, croquant brood, gestoomd brood, pizza en dergelijke.

Voormengsel

15

[0032] De onderhavige uitvinding heeft verder betrekking op een voormengsel omvattende bloem tezamen met een maltogeen α -amylase, een fosfolipase en een fosfolipide. Het voormengsel kan andere deegverbeterende en/of broodverbeterende
20 additieven bevatten, bijvoorbeeld de additieven, waaronder enzymen, als boven genoemd.

Enzympreparaat

[0033] De uitvinding verschaft een enzympreparaat omvattende amylase en een
25 fosfolipase, voor toepassing als bakadditief in de werkwijze van de uitvinding. Het enzympreparaat is bij voorkeur in de vorm van een granulaat of geagglomereerd poeder. Het heeft bij voorkeur een smalle deeltjesgrootteverdeling met meer dan 95 gew. % van de deeltjes in het traject van 25 tot 500 μm .

[0034] Granulaten en geagglomereerde poeders kunnen worden bereid door conventionele methoden, bijvoorbeeld door sproeien van het amylase op een drager in
30 een fluid-bed-granulator. De drager kan bestaan uit deeltjesvormige kernen met een geschikte deeltjesgrootte. De drager kan oplosbaar of onoplosbaar zijn, bijvoorbeeld

EU 1 073 339 B1

een zout (zoals NaCl of natriumsulfaat), een suiker (zoals sucrose of lactose), een suikeralcohol (zoals sorbitol), zetmeel, rijst, maïsgrit of soja.

VOORBEELDEN

5

Voorbeeld 1

[0035] Brood werd gebakken met maltogeen α -amylase, fosfolipase en fosfolipide. Ter vergelijking werd ook brood gebakken zonder één of meer van deze bestandde-
10 len.

[0036] Het fosfolipide was lecithine bij een dosering van 10 g/kg. Het fosfolipase was afkomstig van *Fusarium oxysporum* gebruikt in een dosering van 50, 250 of 500 LU/kg, overeenkomend met 0,04, 0,19 of 0,38 mg/kg. Het amylase tegen oudbakken worden was een maltogeen α -amylase afkomstig van *B. stearothermophilus* (Novamyl) in een dosering van 750 MANU/kg (1 mg/kg). Alle doseringen in de Voorbeel-
15 den waren betrokken op kg bloem.

[0037] Degen werden bereid volgens een standaard Europese procedure voor gewoon deeg met 50 g gist per kg bloem en 40 ppm ascorbinezuur. De degen werden afgewogen op 350 g en gebakken in pannen met deksels.

20 [0038] De kruimstevigheid werd gemeten onder toepassing van een textuur-analyzer TA-XT2 van Stable Micro Systems. De textuur werd gemeten volgens een gemodificeerde methode van de ACCA (American Cereal Chemists' Association). Deze metingen werden uitgevoerd na 0 dagen (ca 2 uur na het bakken) en opnieuw na 1, 2 en 7 dagen bewaring (verpakt in dubbele plastic zakken en bewaard bij 22°C).

25 [0039] De resultaten worden getoond als stevigheid versus additief en bewarings-tijd:

Additieven	Fosfolipase-dosering (LU/kg)	2 uur	1 dag	2 dagen	7 dagen
Uitvinding: Maltogeen α -amylase + fosfolipase + fosfolipide	50	316	417	517	868
	250	279	371	455	790
	500	248	324	410	752
Referentie:					
Geen (controle)	0	296	875	1207	2162
Maltogeen α -amylase	0	469	563	801	1083
Fosfolipide + fosfolipase	50	208	470	782	1560
	250	231	467	721	1424
	500	233	420	649	1303

Voorbeeld 2

- 5 [0040] Een baktest werd uitgevoerd als in Voorbeeld 1, maar met doseringen van 0,5 mg/kg van het fosfolipase (770 LEU/kg) en 1 g/kg van het fosfolipide. De resultaten worden gegeven als stevigheid na bewaring en ter vergelijking wordt de stevigheid ook uitgedrukt in % van de controle.

Additieven	2 uur	5 uur	12 uur	20 uur	dag 2	dag 3
Uitvinding: Maltogeen α -amylase + fosfolipase + fosfolipide	181	195	223	241	277	303
	(78 %)	(65 %)	(51 %)	(46 %)	(34 %)	(32 %)
Referentie:						
Geen (controle)	233	302	434	526	824	959
	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)
Maltogeen α -amylase	372	468	518	482	547	637
	(160 %)	(155 %)	(119 %)	(92 %)	(66 %)	(66 %)
Fosfolipide + fosfolipase	144	144	212	258	364	482
	(62 %)	(47 %)	(49 %)	(49 %)	(44 %)	(50 %)

Voorbeeld 3

- [0041] Een baktest werd uitgevoerd als in de Voorbeelden 1 en 2, onder toepassing van een ander fosfolipase. Het fosfolipase was afkomstig van varkenspancreas met een dosering van 2 mg/kg (1020 LEU/mg). De doseringen van het maltogene α -amylase en het fosfolipide waren als in Voorbeeld 2 en de resultaten worden weergegeven als Voorbeeld 2:

Additieven	2 uur	5 uur	12 uur	20 uur	dag 2	dag 3
Uitvinding: Maltogeen α -amylase + fosfolipase + fosfolipide	342 (122 %)	411 (103 %)	420 (80 %)	431 (73 %)	485 (52 %)	559 (48 %)
Referentie: Geen (controle)	281 (100 %)	398 (100 %)	524 (100 %)	588 (100 %)	937 (100 %)	1157 (100 %)
Maltogeen α -amylase	409 (146 %)	490 (123 %)	514 (98 %)	526 (89 %)	625 (67 %)	673 (58 %)
Fosfolipide + fosfolipase	218 (76 %)	260 (65 %)	367 (70 %)	472 (80 %)	668 (71 %)	906 (78 %)

- 10 [0042] De resultaten van de Voorbeelden 1-3 laten zien dat de toevoeging van maltogeen α -amylase de kruimversteving gedurende bewaring vertraagt, maar de aanvankelijke stevigheid verhoogt vergeleken met de controle zonder additieven. De toevoeging van fosfolipide + fosfolipase volgens de uitvinding is effectief in het vermijden van de verhoogde aanvankelijke stevigheid en vermindert verder de snelheid van kruimversteving gedurende bewaring, vergeleken met maltogeen α -amylase alleen.

Voorbeeld 4

- 20 [0043] Broden werden gebakken met en zonder fosfolipide (lecithine) als hieronder aangegeven. Het fosfolipase was *F. oxysporum* gebruikt bij een dosering van 1 mg/kg (1540 LEU/kg). Het maltogene α -amylase en de bakomstandigheden waren als beschreven in Voorbeeld 1. De resultaten worden gegeven als stevigheid na bewaring:
- EU 1 073 339 B1

				Stevigheid		
	Maltogeen α -amylase MANU/kg	Fosfolipase mg/kg	Fosfolipide g/kg	2 uur	1 dag	3 dagen
Controle	0	0	0	294	687	1179
Uitvinding	750	1	10	200	229	277
	750	1	2	167	218	287
	750	1	1	167	232	305
	750	1	0,5	189	269	333
	750	1	0,1	196	260	381
	750	1	0	199	264	372

- [0044] De resultaten laten zien dat de toevoeging van maltogeen α -amylase en fosfolipase duidelijk de zachtheid, zowel de aanvankelijke zachtheid (2 uur) als
- 5 de zachtheid na bewaring (3 dagen) verbetert. Het verzachtende effect kan verder worden verbeterd door toevoeging van fosfolipide. De optimale dosering blijkt ca 1 mg/kg fosfolipide te zijn.

Conclusies

1. Werkwijze voor de bereiding van een deeg of een gebakken product bereid uit het deeg, omvattende het in het deeg opnemen van een maltogeen α -amylase en een fosfolipase.
5
2. Werkwijze volgens de voorgaande conclusie waarbij het maltogene α -amylase optimale activiteit heeft in brood bij 70-90°C.
- 10 3. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies waarbij het maltogene α -amylase afkomstig is van *B. stearothermophilus*, bij voorkeur van de stam NCIB 11837.
- 15 4. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies waarbij het fosfolipase een temperatuuroptimum van 30-70°C heeft.
- 20 5. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies waarbij het fosfolipase fungaal is, bij voorkeur afkomstig van *Fusarium*, met de meeste voorkeur van *F. oxysporum*.
- 25 6. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies die verder omvat het in het deeg opnemen van een fosfolipide (bij voorkeur lecithine).
7. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies die niet de toevoeging van vet omvat.
8. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies die niet de toevoeging van lysofosfolipide omvat.
- 30 9. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies die niet de toevoeging van emulgeermiddelen anders dan het fosfolipide omvat.

10. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies waarbij het deeg in hoofdzaak bestaat uit bloem, water, gist, zout en suiker.
11. Deeg dat een maltogeen α -amylase en een fosfolipase omvat.
- 5 12. Voormengsel voor deeg, omvattende bloem, een maltogeen α -amylase en een fosfolipase.
13. Enzympreparaat dat een maltogeen α -amylase en een fosfolipase omvat.
- 10 14. Preparaat volgens de voorgaande conclusie dat verder een fosfolipide, bij voorkeur lecithine, omvat.
- 15 15. Preparaat volgens conclusie 13 of 14 dat verder een hemicellulase, bij voorkeur een pentosanase, met meer voorkeur een xylanase, omvat.
16. Preparaat volgens één van de conclusies 13-15 dat een granulaat of een geagglo-mereerd poeder is.
- 20 17. Preparaat volgens één van de conclusies 13-16 waarbij meer dan 95 gew. % een deeltjesgrootte tussen 25 en 500 μ m heeft.